

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена фактора *B* роста эндотелия сосудов (*VEGFB*) с развитием интракраниальных аневризм

Р.И. Султанова^{1,3}, Р.И. Хусаинова^{1,2,3}, Е.Р. Лебедева^{4,5}, М.А. Янкина², Д.В. Гилев⁶, Э.К. Хуснутдинова^{1,2,3}

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

³ Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия

⁴ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

⁵ Международный центр лечения головных болей «Европа-Азия», Екатеринбург, Россия

⁶ Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Интракраниальная аневризма (ИА) – тяжелое заболевание, приводящее вследствие разрыва аневризмы к субарахноидальным кровоизлияниям (САК). Распространенность этого заболевания в мире составляет в среднем около 2–5 %, из которых 50 % случаев заканчиваются летальным исходом либо неврологическими расстройствами различной степени тяжести, с высокой вероятностью рецидива кровоизлияния в течение первого полугодия после разрыва аневризмы. В России субарахноидальные кровоизлияния ежегодно регистрируют не менее чем у 18 тыс. человек. Проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* с развитием интракраниальных аневризм у жителей Волго-Уральского региона Российской Федерации с учетом наличия симптомокомплекса недифференцированной дисплазии соединительной ткани (нДСТ) и артериальной гипертензии (АГ). Аллель *C** *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* является маркером повышенного риска развития ИА в целом ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32), а также у женщин в общей выборке ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70) и в коморбидном состоянии с нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34) и АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.109). Обнаружено, что генотип *C** локуса *rs594942* ассоциирован с риском развития ИА в общей группе ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49), а также у женщин с ИА ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25) и с симптомокомплексом нДСТ ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67) и АГ ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51). Генотип *T** *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* снижает риск развития ИА в сочетании с нДСТ и АГ ($p = 0.014$; $\chi^2 = 6.013$; OR = 0.10). Нами получены новые результаты о роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* в формировании интракраниальных аневризм с учетом наличия симптомокомплекса недифференцированной дисплазии соединительной ткани и артериальной гипертензии у жителей Волго-Уральского региона России. Отягощенный коморбидный фон и наличие нДСТ и АГ могут способствовать повышенному риску развития интракраниальных аневризм, что подтверждается результатами нашего исследования.

Ключевые слова: интракраниальные аневризмы; фактор роста эндотелия сосудов *VEGFB*; недифференцированная дисплазия соединительной ткани; артериальная гипертензия.

Association of vascular endothelial growth factor *B* (*VEGFB*) gene polymorphisms with intracranial aneurysms

R.I. Sultanova^{1,3}, R.I. Khusainova^{1,2,3},
E.R. Lebedeva^{4,5}, M.A. Yankina², D.V. Gilev⁶,
E.K. Khusnutdinova^{1,2,3}

¹ Bashkir State University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

³ Republican Medical Genetics Center, Ufa, Russia

⁴ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

⁵ International Center for the Treatment of Headaches "Europe-Asia", Ekaterinburg, Russia

⁶ Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Intracranial aneurysm (IA) is a complex disease resulting in subarachnoid hemorrhage (SAH) due to a rupture. The average worldwide prevalence of this disease is about 2–5 %, with 50 % of them ending in death or neurological disorders of varying severity, with a high probability of recurrence of hemorrhage during the first half of the year after rupture. Subarachnoid hemorrhage is annually registered in at least 18 thousand people in Russia. Associations of polymorphic variants *rs594942* and *rs11603042* of the *VEGFB* gene in intracranial aneurysm development in the Volga-Ural region of the Russian Federation with the presence of the symptom complex of undifferentiated connective tissue dysplasia (uDST) and arterial hypertension (AH) were investigated. The *C** allele *rs594942* and *rs11603042* of the *VEGFB* gene is a marker of an increased risk of IA as a whole ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32) in women as a whole ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70) and in comorbid state with uDCT ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34) and AG ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.109). We found that the genotype *C** of locus *rs594942* of the *VEGFB* gene is a marker of an increased risk of intracranial aneurysm in general ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49) and among women in general ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25) and with the symptomatic complex uDCT ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67) and AH ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51). We have obtained new results on the role of polymorphic variants of the *VEGFB* gene in the formation of intracranial aneurysm, taking into account the presence of the symptom complex uDCT and AH among the residents of the Volga-Ural region of Russia. A burdened comorbid back-

ground and the presence of undifferentiated connective tissue dysplasia and arterial hypertension can contribute to an increased risk of intracranial aneurysm, as evidenced by the results of our study.

Key words: intracranial aneurysm; vascular endothelial growth factor VEGFB; undifferentiated connective tissue dysplasia; arterial hypertension.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Султанова Р.И., Хусаинова Р.И., Лебедева Е.Р., Янкина М.А., Гилев Д.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена фактора *B* роста эндотелия сосудов (*VEGFB*) с развитием интракраниальных аневризм. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):992-999. DOI 10.18699/VJ18.442

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Sultanova R.I., Khusainova R.I., Lebedeva E.R., Yankina M.A., Gilev D.V., Khusnutdinova E.K. Association of vascular endothelial growth factor *B* (*VEGFB*) gene polymorphisms with intracranial aneurysms. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):992-999. DOI 10.18699/VJ18.442 (in Russian)

Аневризма сосудов головного мозга (интракраниальная аневризма) (МКБ-10 I72) – это патологическое локальное расширение просвета артерии головного мозга, чаще в области бифуркаций, приводящее вследствие разрыва к субарахноидальным кровоизлияниям (САК). Распространенность данного заболевания в мире в среднем составляет около 2–5 % (Cai et al., 2018), 50 % случаев из которых заканчиваются летальным исходом либо неврологическими расстройствами различной степени тяжести, с высокой вероятностью рецидива кровоизлияния в течение первого полугодия после разрыва аневризмы (Peters et al., 2001; Dority et al., 2016). В России САК ежегодно регистрируют не менее чем у 18 тыс. человек (Крылов и др., 2008). Этиология и патогенез интракраниальной аневризмы (ИА) до сих пор до конца не установлены, известно, что данное многофакторное заболевание имеет генетическую основу. Доказана роль ряда факторов, таких как артериальная гипертензия, курение, потребление алкоголя, наркотических веществ, наличие сопутствующих заболеваний соединительной ткани, наследственная отягощенность (Qureshi et al., 2001; Zhang, Clatterbuck, 2008; Tromp et al., 2014; Behrouz et al., 2016; Grant et al., 2016; Qian et al., 2016).

Зачастую ИА встречается у людей с различными клиническими проявлениями недифференцированной дисплазии соединительной ткани (нДСТ), которая является генетически гетерогенным симптомокомплексом, без четких клинико-генеалогических критериев, с различным набором количественных и качественных фенотипических симптомов, обусловленных степенью выраженности структурно-функциональных нарушений твердой и рыхлой соединительной ткани и осложнениями, формирующимися в процессе онтогенеза (Яковлев, Нечаева, 2011). В отличие от дифференцированных форм дисплазии соединительной ткани (ДСТ), вызываемых серьезным дефектом определенного гена с высокой пенетрантностью, нДСТ характеризуется мультигенностью генетической составляющей. Как правило, заболевание возникает при сочетании нескольких дефектов различных генов, причем каждый из них в отдельности не приводит к выраженным фенотипическим проявлениям (Mosca et al., 2012, 2014). Недифференцированная ДСТ может способствовать формированию ИА, так как в основе патогенеза аневризм также лежат изменения структуры соединительной ткани (Яковлев, Нечаева, 2011).

Гемодинамическая нагрузка на сосуды в виде артериальной гипертензии также является ключевым фактором в развитии ИА. Стенка аневризмы утрачивает трехслойное строение, присущее артерии, в ней, как правило, нет мышечного слоя, отсутствует (или сильно недоразвита) внутренняя мембрана и присутствует рубцовая (фиброзная) ткань. Область дна аневризмы – наиболее тонкий участок, который значительно подвержен разрывам, так как представлен одним слоем интимы (Ostergaard et al., 1987; Prockop, Kivirikko, 1995; Schievink, 1999; Скороход, Бричковская, 2007). Постоянное повышение артериального давления или его периодические подъемы могут привести к разрыву измененной стенки сосуда и развитию САК.

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) считается основным в сосудистом новообразовании среди всех ангиогенных факторов (Ferrara, 2009). VEGF действует селективно на сосудистый эндотелий, обеспечивая его стабильность, способствуя пролиферации, миграции и формированию эндотелиальных клеток (Losordo, Diemeler, 2004). Ген *VEGFB* кодирует одноименный белок, участвующий в эмбриональном ангиогенезе, нарушения в котором в конечном итоге также могут привести к изменению строения стенок сосудов, а те, в свою очередь, – к развитию симптомокомплекса нДСТ и ИА.

Аневризма сосудов головного мозга в условиях поздней диагностики или некорректного лечения сопряжена с высоким уровнем смертности и инвалидизации. Поиск маркеров с высокой диагностической значимостью и способов прогнозирования возникновения заболевания до развития САК – актуальная социальная проблема. С учетом значимости наследственных факторов в формировании ИА поиск ДНК-маркеров заболевания позволит диагностировать заболевание до развития осложнений.

Целью настоящей работы стало изучение роли полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* в патогенезе аневризм сосудов головного мозга у жителей Волго-Уральского региона России при наличии симптомокомплекса нДСТ и АГ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 311 больных интракраниальными аневризмами русской этнической принадлежности и 285 практически здоровых индивидов, соответствующих по полу, возрасту и этниче-

Table 1. Age ranges in the studied groups

Groups	n m/f	Age		
		Overall for the group	Men	Women
Patients	311 152/159	48.3±0.72	45.7±1.03	50.9±0.98
IA + UCTD	108 57/51	48.1±1.1	44.8±1.56	51.8±1.39
IA+AH	101 47/54	49.2±1.1	47.6±1.44	50.7±1.62
Control	283 127/156	35.0±0.64	36.4±0.97	34.0±0.85
Control without UCTD	183 102/81	33.4±0.68	36.6±1.01	36.4±1.15
Control without AH	175 96/79	36.4±0.78	32.5±0.85	32.5±1.6

Notes: n, number of individuals; M ± m, mean value ± standard error (standard error = standard deviation/√n).

ской принадлежности, Волго-Уральского региона России в качестве контрольной выборки.

В исследование были включены пациенты Регионального сосудистого центра нейрохирургии на базе нейрохирургических отделений городской клинической больницы № 40 г. Екатеринбурга, у которых диагностирована аневризма, а также пациенты после разрыва аневризмы и хирургического лечения в соответствии со стандартами, разработанными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA) «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» и с одобрения локальных биоэтических комитетов. Исследуемые выборки тестированы по специально составленному протоколу, включающему сведения об этнической принадлежности, количестве аневризм, их локализации, наследственном статусе, потреблении алкоголя, курении. Критериями исключения были: наличие веретенообразных или фузиформных аневризм, наличие сопутствующих заболеваний и состояний, которые могут predispose к сосудистой патологии (атеросклероз, наследственные заболевания соединительной ткани). Возраст больных варьировал от 2 до 76 лет, средний возраст составил 48.3 ± 0.72 года (табл. 1).

Дизайн исследования состоял из следующих этапов:

Сбор данных катамнеза заболевания, анамнеза жизни больных и их родословных осуществлялся в процессе интервью, при клиническом осмотре больных, а также при анализе медицинской документации, данных магнитно-резонансной и компьютерной томографий головного мозга и результатов дополнительных обследований, включающих клинический осмотр, измерение артериального давления, пульса. С целью определения признаков соединительнотканной патологии у всех больных с интракраниальными аневризмами и пациентов контрольной группы общий осмотр проведен по особой методике (Lebedeva, Sakovich, 2013). Он включал определение конституции,

роста, веса, растяжимости кожи над серединой ключицы в положении стоя и толщины кожной складки на тыле кисти. Растяжимость кожи считалась повышенной, если величина кожной складки над наружными концами ключиц была не менее 4.0 см. Кроме того, определялось наличие видимых мелких сосудов на лице, груди и других участках тела, телеангиоэктазий, ангиом, липом, стрий, варикозного расширения вен; выявлялись деформации грудной клетки, сколиоз, плоскостопие, арахнодактилии, диастаз прямых мышц живота, грыж; проводились пробы для выявления гипермобильности суставов. Индекс массы тела (I) был рассчитан по формуле: вес (кг) разделить на рост (м) в квадрате: $I = m/h^2$.

Число маркеров нДСТ среди больных с ИА не менее трех имели 62.8 и 11.8 % людей из контрольной группы ($p < 0.0001$, OR = 12.5, 95 % ДИ = 7.45–21.1). Среднее число маркеров дисплазии оказалось равным 3.07 в группе больных с аневризмами и 1.17 в контрольной группе, поэтому наличие дисплазии соединительной ткани констатировали у лиц, имеющих не менее трех маркеров дисплазии.

Артериальная гипертензия обнаружена у 57.8 % больных аневризмами, в контроле АГ выявлена у 9 % ($p < 0.0001$, OR = 13.38, 95 % ДИ 7.64–23.4). Большинство случаев АГ встречалось в возрасте от 41 до 50 лет (65.8 %). Длительность существования АГ до диагностики аневризмы составила в большинстве случаев пять-десять лет. Для сбора данных использовалась специально разработанная анкета.

Инструментальные исследования. Для выявления аневризм сосудов головного мозга производилась церебральная ангиография на аппарате PHILIPS BW 300, МР-ангиография или КТ-ангиография – на аппаратах PHILIPS TOMOSCAN NT и PHILIPS JIYROSCAN T5. Церебральная ангиография выполнялась под местной анестезией путем зондирования магистральных артерий головы через бедренную артерию по способу Сельдингера. Кроме того, выполнялась компьютерная или магнитно-резонансная томография головного мозга, а также транскраниальная доплерография на аппарате APOGEE 800 PLUS, ATL (США). В качестве скринингового исследования сосудов головного мозга выполнялась МР-ангиография.

Молекулярно-генетические исследования. Выделение ДНК из цельной крови проводилось методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985). Генотипирование локусов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени с применением TaqMan технологии и разработанных нами праймеров и зондов, несущих флуорофор и тушител, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента на ДНК-амплификаторе CFX96 Touch Deep Well Real-time PCR Detection System (Bio-Rad), обладающей возможностью детекции и анализа флуоресценции по конечной точке с использованием встроенных средств программного обеспечения (Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028). Характеристика использованных локусов гена *VEGFB* представлена в табл. 2.

Статистический анализ результатов. Для всех рассматриваемых групп проводили оценку соответствия эмпирических распределений частот генотипов ожидаемому,

Table 2. Characteristics of the studied loci of the *VEGFB* gene

Locus	Primer sequence (5'→3')	Detection method	Reference
<i>rs594942</i> c.*487 T>C	FJ, CCAACCCTGATAAAAGAGA RJ, CCTCATTTCTCCATCTG FAM-ttgTcAcTgTcCag-BHQ-1 VIC-ttgTcAcTgCcCag-BHQ-2	TaqMan	Domestic protocol
<i>rs11603042</i> c.374+44G>T	FJ, CCCTGTCTTCTCCTGAGCA RJ, GGTCCCCAGTTCTGTGGA FAM-agcaccCccAaaGcct-BHQ-1 VIC-agcaccCccCaaGcct-BHQ-2	»	»

согласно уравнению Харди–Вайнберга. Был проведен сравнительный анализ аллелей и генотипов с использованием таблиц сопряженности 2 × 2 Version 4.12.14. Различия считались статистически значимыми при уровне $p > 0.05$.

При анализе группы пациентов с аневризмами с группой контроля, а затем отдельно выделенных подгрупп мужчин и женщин используются одни и те же данные при выполнении двух сравнений. Поэтому мы применили поправку Бонферрони, считая значимыми результаты, для которых значение $p\text{-value} < 0.05/2 = 0.025$. Поправка на множественность введена с учетом числа сравнений в рамках одной модели. Аналогично сравнение групп пациентов с дисплазией и без дисплазии и проведение сравнений подгрупп мужчин и женщин, затем при сравнении групп пациентов с гипертензией и без гипертензии, при сравнении групп пациентов с гипертензией + дисплазия и без обоих сопутствующих заболеваний.

Результаты

Ген *VEGFB* локализован на 11-й хромосоме в области q13.1 и имеет семь экзонов. Исследованные нами полиморфные варианты *rs11603042* и *rs594942* расположены в четвертом интроне и в 3'-нетранслируемой области гена соответственно.

В ходе исследования проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* между выборками больных ИА и контроля с учетом гендерных различий, наличия признаков нДСТ и артериальной гипертензии, а также выполнен поиск ассоциаций изученных локусов с ИА в изолированном и коморбидном состояниях.

Согласно базе данных 1000 геномов для европейской популяции, сцепленность между двумя выбранными полиморфизмами полная: $D' = 1$, $R^2 = 0.9911$ (<https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/?tab=ldpair>). При проведении нашего исследования эти данные подтвердились, что позволило рассмотреть локусы *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* как один локус с идентичным распределением частот аллелей и генотипов, аллели также оказались идентичными. Подробная характеристика изученных локусов представлена в табл. 3.

При исследовании полиморфного варианта *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* частота аллеля *C составила 0.693 в выборке с ИА и оказалась выше, чем в группе контроля, где ее частота не превышала 0.631, различия достигли статистической значимости ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$). Аллель *C является маркером повышенного риска развития ИА

Table 3. Characteristics of the *rs594942* and *rs11603042* loci of the *VEGFB* gene in groups of patients with AI in general and with comorbid AH and UCTD as compared to the control group

Patient group	H _{pred}	H _{obs}	HW _{pval}	MAF
Overall	0.447	0.462	0.481	(*T) 0.337
IA + UCTD	0.449	0.486	0.212	(*T) 0.340
IA + AH	0.447	0.474	0.388	(*T) 0.337
Control	0.466	0.500	0.284	(*T) 0.370

Notes: H_{obs}, observed heterozygosity; H_{pred}, expected heterozygosity; HW_{pval}, index p for assessing the compliance with the Hardy–Weinberg equilibrium ($p > 0.05$); MAF, the frequency of the minor allele.

(OR = 1.32; 95 % ДИ 1.04–1.68). Частота гомозиготного генотипа *C*C была также выше в группах больных с ИА по сравнению с группой контроля, у носителей гомозиготного варианта рискованного аллеля риск развития ИА был еще выше ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$; OR = 1.49; 95 % ДИ 1.07–2.07) (табл. 4).

В нашей выборке пациентов с ИА оказалось 51.13 % женщин и 48.87 % мужчин. При рассмотрении выборки с учетом гендерных различий выявленная ассоциация подтвердилась только у женщин. Частота аллеля *C в группе женщин с ИА составила 0.698, тогда как в группе контроля не превышала 0.576 ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70; 95 % ДИ 1.22–2.36). Генотип *C*C также оказался рискованным ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25; 95 % ДИ 1.42–3.57).

Проведен анализ исследуемых выборок с учетом наличия клинических признаков нДСТ и АГ в коморбидном состоянии с ИА для выявления роли изученных локусов в формировании ИА в комплексе с фоновыми заболеваниями.

Оказалось, что у 25.78 % женщин и 19.08 % мужчин с ИА встречается симптомокомплекс нДСТ в сочетании с АГ. При этом у 33.96 % женщин и 30.92 % мужчин ИА сопровождается наличием только АГ, а у 37.5 % мужчин и 32.08 % женщин – клиническими проявлениями нДСТ, без АГ. Только у 12.5 % мужчин и 8.18 % женщин выявлена ИА в изолированном состоянии, без клинических проявлений АГ и нДСТ, что свидетельствует о важной роли этих патологий в качестве факторов, способствующих развитию аневризм сосудов головного мозга. Мы провели анализ ассоциаций изученных локусов гена *VEGFB* с ИА с учетом наличия АГ и нДСТ в отдельности и в со-

Table 4. Comparison of frequency distributions of alleles and genotypes for *rs594942* and *rs11603042* in the *VEGFB* gene between groups of patients with IA and control with regard to gender

Sample	n	Allele frequencies		Genotype frequencies		
		*T	*C	*T*T	*C*T	*C*C
Patients with IA	309	(190) 0.307 $p = 0.025$ $\chi^2 = 5.052$ OR = 0.76 (0.60–0.97)	(428) 0.693 $p = 0.025$ $\chi^2 = 5.052$ OR = 1.32 (1.04–1.68)	(29) 0.094	(132) 0.427	(148) 0.479 $p = 0.017$ $\chi^2 = 5.702$ OR = 1.49 (1.07–2.07)
Control without IA	283	(209) 0.369	(357) 0.631	(34) 0.120	(141) 0.498	(108) 0.382
Men with IA	150	(94) 0.313	(206) 0.687	(14) 0.093	(66) 0.440	(70) 0.467
Control men without IA	126	(76) 0.301	(176) 0.698	(11) 0.087	(54) 0.429	(61) 0.484
Women with IA	159	(96) 0.301 $p = 0.001$ $\chi^2 = 10.124$ OR = 0.59 (0.42–0.82)	(222) 0.698 $p = 0.001$ $\chi^2 = 10.124$ OR = 1.70 (1.22–2.36)	(15) 0.094	(66) 0.415 $p = 0.013$ $\chi^2 = 6.12$ OR = 0.57 (0.37–0.89)	(78) 0.491 $p = 0.0005$ $\chi^2 = 12.078$ OR = 2.25 (1.42–3.57)
Control women without IA	157	(133) 0.424	(181) 0.576	(23) 0.146	(87) 0.544	(47) 0.299

Notes: n, number of subjects.

четании. Так, женщины с аллелями *C локусов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* оказались более подвержены риску развития ИА при наличии симптомокомплекса нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34; 95 % ДИ 1.35–4.05) (табл. 5).

При носительстве гомозиготных генотипов *C*C по обоим исследованным локусам гена *VEGFB* риск развития ИА в сочетании с нДСТ у женщин также возрастает ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67; 95 % ДИ 1.29–5.53). Генотип *T*T оказался протективным маркером развития ИА у женщин с нДСТ ($p = 0.023$; $\chi^2 = 5.150$; OR = 0.10; 95 % ДИ 0.01–0.83).

Аллель *C исследуемых локусов также оказался рискованным у женщин с ИА с симптомокомплексом АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.09; 95 % ДИ 1.22–3.59).

Генотипы *C*C *rs594942* и *rs11603042* оказались маркерами повышенного риска развития ИА в сочетании с АГ у женщин ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51; 95 % ДИ 1.23–5.12).

Учитывая, что у достаточно большого числа пациентов с ИА встречаются оба фоновых состояния, мы провели анализ результатов исследования при наличии как АГ, так и нДСТ в сочетании с ИА и сравнили с контрольной выборкой с отсутствием таковых признаков.

Генотип *T*T *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* снижает риск развития ИА в сочетании с нДСТ и АГ ($p = 0.014$; $\chi^2 = 6.013$; OR = 0.10; 95 % ДИ 0.01–0.76) (см. табл. 5).

Таким образом, аллель *C *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* – маркер повышенного риска развития ИА в целом ($p = 0.025$; $\chi^2 = 5.052$; OR = 1.32; 95 % ДИ 1.04–1.68), у женщин в целом ($p = 0.001$; $\chi^2 = 10.124$; OR = 1.70; 95 % ДИ 1.22–2.36) и в коморбидном состоянии с нДСТ ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.501$; OR = 2.34; 95 % ДИ 1.35–4.05) и АГ ($p = 0.006$; $\chi^2 = 7.385$; OR = 2.109; 95 % ДИ 1.22–3.59).

Генотип *C*C локусов *rs594942* и *rs11603042* ассоциирован с риском развития ИА в целом ($p = 0.017$; $\chi^2 = 5.702$;

OR = 1.49; 95 % ДИ 1.07–2.07), а также у женщин в целом ($p = 0.0005$; $\chi^2 = 12.078$; OR = 2.25; 95 % ДИ 1.42–3.57) и с симптомокомплексом нДСТ ($p = 0.007$; $\chi^2 = 7.173$; OR = 2.67; 95 % ДИ 1.29–5.53) и АГ ($p = 0.010$; $\chi^2 = 6.471$; OR = 2.51; 95 % ДИ 1.23–5.12).

Обсуждение

Ангиогенез – многоступенчатый процесс образования новых кровеносных сосудов, который стимулируется гипоксией и ангиогенными факторами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) и др. Нарушения на любых этапах ангиогенеза могут привести к сосудистым патологиям, в том числе к развитию ИА.

Белки, относящиеся к семейству VEGF, – гликопротеины, стимулирующие формирование новых кровеносных и лимфатических сосудов и увеличивающие их проницаемость. Взаимодействие между VEGF и рецептором активирует остаток тирозина, находящегося в интрацитоплазматической части рецептора, и запускает различные сигнальные каскады в эндотелиальных клетках, такие как пролиферация, миграция и увеличение сосудистой проницаемости (Guo et al., 2010).

В исследовании (Liu et al., 2016) обнаружено, что концентрация VEGF в сыворотке крови у пациентов на поздней стадии развития аневризмы была значительно выше, чем на более ранних стадиях. Аналогичное исследование было проведено М. Ху с коллегами (2016), в котором выборки пациентов с аневризмой аорты разделили по стадиям заболевания. Результаты показали, что сывороточные концентрации VEGF в группе с поздними стадиями ИА были значительно выше, чем концентрации в группе со средней стадией, а у тех пациентов, в свою очередь, выше, чем у пациентов с ранней стадией, что предполагает клиническую ценность данного маркера для ранней диагностики и

Table 5. Comparison of frequency distributions of alleles and genotypes for rs594942 and rs11603042 in the *VEGFB* gene with regard to comorbid UCTD and AH

Sample	n	Allele frequency		Genotype frequency		
		*T	*C	*C*C	*C*T	*T*T
IA + UCTD	108	(152) 0.717	(60) 0.283	(50) 0.472	(52) 0.491	(4) 0.037 $p = 0.009$ $\chi^2 = 6.693$ OR = 0.26 (0.09–0.77)
Control without UCTD	184	(230) 0.628	(136) 0.372	(71) 0.388	(88) 0.481	(24) 0.131
IA + UCTD women	51	(77) 0.755 $p = 0.002$ $\chi^2 = 9.501$ OR = 2.34 (1.35–4.05)	(25) 0.245 $p = 0.002$ $\chi^2 = 9.501$ OR = 0.43 (0.25–0.74)	(27) 0.529 $p = 0.007$ $\chi^2 = 7.173$ OR = 2.67 (1.29–5.53)	(23) 0.451	(1) 0.020 $p = 0.023$ $\chi^2 = 5.150$ OR = 0.10 (0.01–0.83)
Control women without IA or UCTD	81	(92) 0.568	(70) 0.432	(24) 0.296	(44) 0.543	(13) 0.160
IA + UCTD men	57	(75) 0.682	(35) 0.318	(23) 0.418	(29) 0.527	(3) 0.055
Control men without IA or UCTD	102	(137) 0.678	(65) 0.322	(47) 0.465	(43) 0.426	(11) 0.109
IA + AH	101	(142) 0.703	(60) 0.297	(46) 0.455	(50) 0.495	(5) 0.050
Control without IA or AH	176	(219) 0.626	(131) 0.374	(66) 0.377	(87) 0.497	(22) 0.126
IA+ AH women	54	(81) 0.750 $p = 0.006$ $\chi^2 = 7.39$ OR = 2.09 (1.22–3.59)	(27) 0.250 $p = 0.006$ $\chi^2 = 7.39$ OR = 0.48 (0.28–0.82)	(29) 0.537 $p = 0.010$ $\chi^2 = 6.471$ OR = 2.51 (1.23–5.12)	(23) 0.426	(2) 0.037
Control women without IA or AH	79	(93) 0.589	(65) 0.411	(25) 0.316	(43) 0.544	(11) 0.139
IA + AH men	47	(61) 0.649	(33) 0.351	(17) 0.362	(27) 0.574	(3) 0.064
Control men without IA or AH	96	(125) 0.658	(65) 0.342	(41) 0.431	(43) 0.453	(11) 0.116
IA + UCTD + AH	70	(102) 0.729	(38) 0.271	(1) 0.014 $p = 0.014$ $\chi^2 = 6.013$ OR = 0.10 (0.01–0.76)	(36) 0.514	(33) 0.471
Control without UCTD or AH	167	(210) 0.629	(124) 0.371	(21) 0.126	(82) 0.491	(64) 0.383
IA + UCTD + AH women	41	(62) 0.756	(20) 0.244	(1) 0.024	(18) 0.439	(22) 0.537
Control women without IA, UCTD, or AH	91	(120) 0.066	(62) 0.934	(11) 0.120	(40) 0.440	(40) 0.440
IA + UCTD + AH men	29	(40) 0.690	(18) 0.310	–	18 (0.621)	(11) 0.379
Control men without IA, UCTD, or AH	76	(90) 0.592	(62) 0.408	10 (0.132)	(42) 0.553	24 (0.316)

Notes: n, number of subjects. Over three UCTD markers were analyzed in subjects with UCTD.

оценки тяжести заболевания (Xu et al., 2016). М. Wolanska с коллегами (2015) обнаружили повышенную экспрессию гена *VEGFB* (269 ± 31 %) у пациентов с аневризмой брюшной аорты, что предполагает значительную роль данного гена в патологии сосудов и патогенезе аневризм. Однако в доступной литературе не очень много исследований по поиску значимости полиморфных вариантов гена *VEGFB* в развитии аневризм.

Выявлена ассоциация гаплотипов полиморфных вариантов гена *VEGFB* у матери с задержкой роста плода (малый плод для гестационного возраста) у латиноамериканок (Edwards et al., 2011). Согласно данным исследовательской группы из Бельгии, гаплотипы полиморфных вариантов *rs3741403*, *rs1058735* и *rs594942* гена *VEGFB* ассоциированы со II фазой метастатического колоректального рака (Lambrechts et al., 2015). Группой ученых

(Sudhesan et al., 2017) был проведен анализ роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* (*rs699947*, *rs833061* и *rs2010963*) в развитии псориаза в южноиндийской популяции тамиллов, по данным которого гаплотип *CTC гена *VEGF* является маркером повышенного риска развития псориаза, а уровень VEGF в плазме крови выше у пациентов с псориазом по сравнению с контролем и значительно коррелирует с тяжестью заболевания (Sudhesan et al., 2017).

Нами получены новые результаты о роли полиморфных вариантов гена *VEGFB* в формировании ИА с учетом наличия симптомокомплекса нДСТ и АГ у жителей Волго-Уральского региона России. Отягощенный коморбидный фон и наличие нДСТ и АГ могут способствовать повышенному риску развития ИА, что подтверждается результатами нашего исследования. Наличие симптомокомплекса нДСТ и АГ в целом и в отдельности у лиц молодого возраста могут быть значимыми прогностическими факторами риска ИА на этапах диспансерного наблюдения при профессиональной ориентации, медицинской экспертизе, определении возможности занятия спортом, оценке противопоказаний при оперативных вмешательствах и служить дополнительными маркерами риска развития и выявления ИА до стадии САК с учетом наличия генетических маркеров заболевания.

Таким образом, в нашем исследовании выявлена значимость полиморфных вариантов *rs594942* и *rs11603042* гена *VEGFB* в формировании ИА в целом и с учетом наличия сопутствующих заболеваний соединительной ткани и артериальной гипертензии. Обнаружены гендерные различия в распределении частот аллелей и генотипов исследуемых локусов, что требует дальнейшего изучения в независимых выборках больных ИА из различных популяций других регионов России и мира. Выявлено, что наличие нДСТ и АГ увеличивает риск развития ИА.

Acknowledgements

Experiments were performed with human tissue samples from the collection of the Institute of Biochemistry and Genetics, Uralian Research Center, Russian Academy of Sciences. This work was supported by the FASO Russia program for the development of bioresource collections.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Крылов В.В., Природов А.В., Петриков С.С. Нетравматическое субарахноидальное кровоизлияние: диагностика и лечение. Неврология и ревматология. 2008;1:14-18.
[Krylov V.V., Prirodov A.V., Petrikov S.S. Nontraumatic subarachnoid hemorrhage: diagnosis and treatment. *Nevrologiya i Revmatologiya* = *Neurology and Rheumatology*. 2008;1:14-18. (in Russian)]
Скорород А.А., Бричкова Т.В. Артериальные аневризмы головного мозга: этиология, патогенез. Медицинский журнал (Минск). 2007;3:4-7.
[Skorokhod A.A., Brichkovskaya T.V. Arterial aneurysms of the brain: etiology and pathogenesis. *Meditinskiy Zhurnal* (Minsk) = *Medical Journal* (Minsk). 2007;3:4-7. (in Russian)]
Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней. Сиб. мед. журнал. 2011;3:9-12.

[Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Systemic connective tissue dysplasia: the urgency of the problem in the internal disease clinic. *Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal* = *Siberian Medical Journal*. 2011;3:9-12. (in Russian)]
Behrouz R., Birnbaum L., Grandhi R., Johnson J., Misra V., Palacio S., Seifi A., Topel C., Garvin R., Caron J.L. Cannabis use and outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2016; 47(5):1371-1373. DOI 10.1161.
Cai W., Hu C., Gong J., Lan Q. Anterior communicating artery aneurysm morphology and the risk of rupture. *World Neurosurg*. 2018; 109:119-126. DOI 10.1016.
Dority J.S., Oldham J.S. Subarachnoid hemorrhage: an update. *Anesthesiol. Clin*. 2016;34(3):577-600. DOI 10.1016.
Edwards D.R., Romero R., Kusanovic J.P., Hassan S.S., Mazaki-Tovi S., Vaisbuch E., Kim C.J., Erez O., Chaiworapongsa T., Pearce B.D., Bartlett J., Friel L.A., Salisbury B.A., Anant M.K., Vovis G.F., Lee M.S., Gomez R., Behnke E., Oyarzun E., Tromp G., Menon R., Williams S.M. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding for proteins involved in extracellular matrix metabolism alter the risk for small-for-gestational-age. *J. Matern. Fetal Neonatal. Med*. 2011;24(2):362-380. DOI 10.3109/14767058.
Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw*. 2009;20(4):158-163. DOI 10.1684/ecr.
Grant R.A., Cord B.J., Kuzomunhu L., Gilmore E., Matouk C.C. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and severe, catheter-induced vasospasm associated with excessive consumption of a caffeinated energy drink. *Interv. Neuroradiol*. 2016;22(6):674-678.
Guo S., Colbert L.S., Fuller M., Zhang Y., Gonzalez-Perez R.R. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1806(1):108-121. DOI 10.1016/j.bbcan.
Lambrechts D., Thienpont B., Thuillier V., Sagaert X., Moisse M., Peuteman G., Pericay C., Folprecht G., Zalberg J., Zilocchi C., Margherini E., Chiron M., Van Cutsem E. Evaluation of efficacy and safety markers in a phase II study of metastatic colorectal cancer treated with aflibercept in the first-line setting. *Br. J. Cancer*. 2015; 113(7):1027-1034. DOI 10.1038/bjc.2015.329.
Lebedeva E.R., Sakovich V.P. Systemic connective tissue abnormalities in patients with saccular intracranial aneurysms. *Acta Neurol. Scand*. 2013;128:130-135.
Liu P., Zhou Y., An Q., Song Y., Chen X., Yang G.Y., Zhu W. Erythropoietin stimulates endothelial progenitor cells to induce endothelialization in an aneurysm neck after coil embolization by modulating vascular endothelial growth factor. *Stem Cells Transl. Med*. 2016; 5(9):1182-1189.
Losordo D.W., Diommeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part 1: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004;109:2487-2491.
Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods Mol. Biol*. 1985;2:31-34. DOI 10.1385/0-89603-064-4:31.
Mosca M., Tani C., Carli L., Bombardieri S. Undifferentiated CTD: a wide spectrum of autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2012;26:73-77. DOI 10.1016/j.bberh.
Mosca M., Tani C., Vagnani S., Carli L., Bombardieri S. The diagnosis and classification of undifferentiated connective tissue diseases. *J. Autoimmun*. 2014;48-49:50-52. DOI 10.1016/j.jaut.
Ostergaard J.R., Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms. *J. Neurosurg*. 1987; 67:690-696.
Peters D.G., Kassam A.B., Feingold E., Heidrich-O'Hare E., Yonas H., Ferrell R.E., Brufsky A. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: Coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke*. 2001;32:1036-1042.
Prockop D.J., Kivirikko K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem*. 1995;64:403-434.

- Qian Z., Kang H., Jiang C., Tang K., Jiang C., Wu Z., Li Y., Liu A. Assessment of risk of aneurysmal rupture in patients with normotensives, controlled hypertension, and uncontrolled hypertension. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2016;25(7):1746-1752.
- Qureshi A.I., Suri M.F., Yahia A.M., Suarez J.I., Guterman L.R., Hopkins L.N., Tamargo R.J. Risk factors for subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2001;49:607-612.
- Schievink W.I. Marfan syndrome and intracranial aneurysms. *Stroke.* 1999;30:2767-2768.
- Sudhesan A., Rajappa M., Chandrashekar L. Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene polymorphisms (*rs699947*, *rs833061*, and *rs2010963*) and psoriatic risk in south indian tamils. *Hum. Immunol.* 2017;78(10):657-663. DOI 10.1016/j.humimm.2017.08.004.
- Tromp G., Weinsheimer S., Ronkainen A., Kuivaniemi H. Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. *Ann. Med.* 2014;46(8):597-606. DOI 10.3109/07853890.2014.949299.
- Xu M., Zhang Y., Tang L., Huang H. Concentration analysis of hypoxia-inducible factor-1 α ; and vascular endothelial growth factor in patients with aortic aneurysm at different stages and its clinical significance. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand).* 2016;62(1):73-76.
- Wolanska M., Bankowska-Guszczyn E., Sobolewski K., Kowalewski R. Expression of VEGFs and its receptors in abdominal aortic aneurysm. *Int. Angiol.* 2015;34(6):520-528.
- Zhang J., Clatterbuck R.E. Molecular genetics of human intracranial aneurysms. *Int. J. Stroke.* 2008;3(4):272-287. DOI 10.1111/j.1747-4949.

ORCID ID

R.I. Sultanova orcid.org/0000-0002-5158-0880
R.I. Khusainova orcid.org/0000-0002-8643-850X
E.R. Lebedeva orcid.org/0000-0003-2463-7113
M.A. Yankina orcid.org/0000-0003-0441-5169
D.V. Gilev orcid.org/0000-0003-1040-5696
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334